

Mètodes de seqüenciació de nova generació i les seves aplicacions clíniques.

Treball Final de Grau. Grau en Biologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Juny 2014

Zaida Carratala Parra, tutoritzada per Aurora Rufé



Introducció i objectius.

Els mètodes de seqüenciació de nova generació (o NGS del anglès *Next-generation sequencing*) són una nova metodologia de seqüenciació que permeten seqüenciar genomes complets en poc de temps i amb un cost menor que el mètode Sanger (o mètodes de primera generació). En aquest treball es pretén fer un recull dels diferents tipus de NGS que trobem i quines aplicacions se'ls hi pot donar, sobretot de cara a l'aplicació clínica.

Mètodes de seqüenciació de nova generació.

Els NGS engloben una sèrie de metodologies de seqüenciació diferents, però que totes consisteixen en una preparació de la plantilla, la seqüenciació i la projecció d'imatge, i l'anàlisi de dades. La combinació única de protocols específics distingeix les diferents tecnologies i determina el tipus de dades produïdes a partir de cada plataforma.

Actualment trobem diferents plataformes, les quals trobem comparades a la taula 1; però tots els mètodes segueixen una metodologia molt semblant que trobem explicada a la figura 1.

Preparació de plantilles

- Les plantilles que es fan servir als NGS estan fixades a suports sòlids per el que queden separades espacialment, i permet que milers de milions de reaccions de seqüenciació es donen simultàniament.
- Hi ha dos mètodes per a la preparació de les plantilles dels NGS:
 - **Plantilles obtingudes de l'amplificació de molècules senzilles de DNA.** Les metodologies més emprades per a l'obtenció d'aquestes plantilles és l'emulsió de PCR i l'amplificació de fase sòlida.
 - **Plantilles obtingudes de molècules senzilles de DNA.** Aquests mètodes no requereixen PCR i, per tant, eviten problemes de mutacions o males amplifícacions relacionades amb la metodologia de les PCR. Abans de la seqüenciació una molècula de DNA s'immobilitza en un suport sòlid.

Seqüenciació i projecció d'imatge

- La metodologia emprada dependrà de si les molècules han sigut amplifícades o no: les molècules que han sigut amplifícades formen una colònia de plantilles clòniques, cadascuna de les quals serà seqüenciada, i la imatge s'obindrà d'un consens de totes aquestes seqüenciacions.
- Hi ha diferents metodologies:
 - **Terminació reversible cíclica (CRT).** Una DNA polimerasa incorpora un nucleòtid modificat que emet fluorescència, acaba la síntesis de DNA i es realitza una imatge per tal de veure el nucleòtid modificat afegit. Es fa un rentat o excisió per eliminar el factor d'inhibició i el nucleòtid modificat, i es torna a començar. El més important d'aquesta tècnica és el fet de que el terminador és reversible i es pot tornar a donar la reacció. Hi ha diferents terminadors, i diferents colors de fluorescència.
 - **Seqüenciació per lligament.** És una altra mètode cíclic, però amb una DNA ligasa. Una sonda marcada fluorescentment s'hidrba amb la seva seqüència complementària, i s'afegeix una DNA ligasa perquè s'uneixin; s'eliminen les sondes no lligades i es realitza una imatge de les senyals de fluorescència, i es va repetint el cicle.
 - **Adició d'un nucleòtid o piroseqüenciació.** És un mètode de bioluminescència basat en la mesura de la proporció de pirofosfat inorgànic que es allibera; aquest alliberament es converteix en llum visible gràcies a una sèrie de reaccions enzimàtiques. Es manipula la DNA polimerasa, a la que se li afegeix un dNTP que és l'encarregat de que es vagin produint els cicles successius.
 - **Seqüenciació en temps real.** No s'atura la síntesis de DNA: es realitzen imatges contínues de l'addició de nucleòtids marcats amb colorant durant la síntesis del DNA.

Alineament i ensamblatge

- Es realitza la seqüenciació de la mostra i s'alinea amb una seqüència de referència; també es pot realitzar ensamblatge *de novo* però encara dona molts errors.

Plataforma	Preparació plantilles	Química NGS	Mida de lectura (bases)	Temps (dies)	Pros	Contres	Aplicacions
Roche	Emulsió PCR	Piroseqüenciació	330	0.35	→ Millora de les lectures de regions repetitives. → Rapidesa	→ Alt cost	Seqüències de novo
Illumina Solexa	Amplificació de fase sòlida	Terminació reversible	75-100	4-9	→ Més utilitzades	→ Baixa multiplexació	Descobrimet de gens en metagenòmica
SOLID	Emulsió PCR	Seqüenciació per lligament	50	7-14	→ Correcció d'errors	→ Temps de lectura gran	Descobrimet de gens en metagenòmica
Polonator	Emulsió PCR	Seqüenciació per lligament	26	5	→ Més econòmica → Capacitat d'adaptació a diverses químiques NGS	→ Requereix manteniment i control de qualitat dels reactius	Resequenciació de genomes bacterians
Helicos BioSciences Heliscope	Molècula senzilla	Piroseqüenciació	32	8	→ Sense biaix a la representació de plantilles	→ Genera més errors que la resta	Metodologies basades en seqüenciació
Pacific Biosciences	Molècula senzilla	Temps real	964	-	→ Millor potencial de lectura	→ La que més errors genera	Complement de seqüenciació de tot el genoma

Taula 1. Comparació de les diferents plataformes de NGS. Adaptada de Metzker ML (2.011) ¹.

Figura 1. Metodologia dels NGS.

Avantatges	Inconvenients
<ul style="list-style-type: none">✓ Aporten una major rapidesa respecte del mètode Sanger. Tenen la capacitat de seqüenciar 5 genomes humans en una setmana.✓ És més barat, seqüenciar un genoma costa aproximadament uns 5.000\$.✓ Té flexibilitat de resolució, el que permet escollir el grau de resolució variant en les diferents regions del genoma.	<ul style="list-style-type: none">✗ Necessitat d'eines bioinformàtiques i professionals qualificats.✗ La relació entre el cost i l'efectivitat encara no és suficient.✗ Generació espontània d'errors.✗ Males seqüenciacions, degudes a la mida dels fragments (sobretot en seqüències <i>de novo</i> o en fragments de genoma que no es té seqüència de referència).

Taula 2. Avantatges i inconvenients dels NGS respecte a les metodologies clàssiques.

Aplicacions.

Biologia comparativa	Genomes petits	DNA mitocondrial	Clíniques
<ul style="list-style-type: none">• Establir relacions filogenètiques.	<ul style="list-style-type: none">• Genomes bacterians que ens permeten entendre relacions patogèniques.• Genomes d'espècies parasites.	<ul style="list-style-type: none">• El DNA mitocondrial estableix relacions de llinatge matern.• Indica susceptibilitat a malalties.	<ul style="list-style-type: none">• Susceptibilitat a malalties complexes i a fàrmacs.• Creació d'anticossos monoclonals per a teràpies.• Detecció de tumors i càncers.

Figura 2. Aplicacions dels NGS.

Medicina personalitzada.

Una de les grans promeses de la seqüenciació es poder arribar a realitzar medicina personalitzada, el que vol dir que gràcies a un estudi del genoma dels pacients es podran prevenir, tractar o curar malalties a la carta.

Avui en dia, prometre una medicina personalitzada és arribar perquè encara queda molta feina per fer però molts autors opinen que la medicina personalitzada arribarà algun dia a les nostres vides; a més segons l'article de Chen i Shi (2013)² la tecnologia dels NGS millorarà i facilitarà la seva aplicació a la medicina personalitzada.

Necessitem

- Alt grau de coneixement del genoma (gens susceptibles a malalties i a fàrmacs).
- Professionals qualificats i millores tecnològiques.

Tenim

- Mètodes de seqüenciació massiva → NGS.
- Genoma humà complet.

Conclusions.

Els NGS aporten millores respecte al mètode Sanger però cal continuar treballant per tal de perfeccionar la tècnica, ja que encara presenten errors i el seu cost encara és massa elevat. Per tal de poder aplicar els NGS com a una prova clínica cal, a més de perfeccionar la tècnica, espais i professionals qualificats. La medicina personalitzada cada cop es troba més a prop de nosaltres i els NGS són uns bons candidats a servir com a eina indispensable per a la seva realització. Avui en dia, ja trobem els NGS com a eina per a molts estudis, però encara són massa cars per a la seva utilització clínica.

Referències.

1. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46. doi:10.1038/nrg2626.
2. Chen G, Shi T. Next-generation sequencing technologies for personalized medicine: promising but challenging. *Sci China Life Sci.* 2013;56(2):101-3. doi:10.1007/s11427-013-4436-x.